

## STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Zanieczyszczenie tworzywami sztucznymi uznawane jest obecnie za globalny problem. Co roku do środowiska dostają się olbrzymie ilości odpadów plastikowych w wyniku niewłaściwej gospodarki odpadami i niewystarczający recykling, a także z uwagi na długi okres rozkładu tych tworzyw. W 2021 roku na świecie wytworzono 390,7 mln ton plastiku w tym 57,2 mln ton w Europie. Poważne zagrożenie ekotoksykologiczne dla organizmów stanowią cząstki powstałe z rozpadu dużych fragmentów plastiku tzw. mikrocząstki o średnicy  $< 5000$  nm oraz nanocząstki o średnicy  $< 100$  nm, których obecność stwierdzono w powietrzu, wodzie, glebie i żywności. Mikro i nanocząstki są szeroko stosowane w różnych gałęziach przemysłu m.in. farmaceutycznym, laboratoryjnym oraz kosmetycznym.

Jednym z najczęściej badanych tworzyw syntetycznych o strukturze nanometrycznej jest polistyren powstający w procesie polimeryzacji monomerów styrenu. Tworzywo to wykorzystywane jest do produkcji opakowań, sprzętu elektronicznego i AGD oraz stosowane do ocieplania budynków (styropian). Cząstki polistyrenu ze względu na małe rozmiary, mogą łatwo przedostawać się do organizmów żywych poprzez układ oddechowy, pokarmowy czy przez skórę i w konsekwencji przechodzić przez bariery biologiczne i kumulować się w tkankach.

Celem badań niniejszej pracy doktorskiej była ocena działania prooksydacyjnego, proapoptotycznego i genotoksycznego nanocząstek polistyrenu (PS-NP) o różnych średnicach (29 nm, 44 nm i 72 nm) w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka.

Na wstępie przeprowadzono badania właściwości fizyko-chemicznych nanocząstek polistyrenu w celu potwierdzenia zadeklarowanej przez producentów ich średnicy. Uzyskane zdjęcia oraz wyniki z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM) i skaningowej mikroskopii atomowej (SEM) były zgodne z parametrami podanymi przez producenta cząstek. Badania wykonane za pomocą techniki pomiaru wielkości cząstek (DLS) polistyrenu inkubowanych w wodzie także potwierdziły średnicę cząstek, którą deklarowali producenci, podczas gdy inkubacja badanych cząstek w pożywce RPMI znacząco zwiększała ich średnicę, nawet trzykrotnie w przypadku najmniejszych nanocząstek. Ponadto, dokonano oceny potencjału zeta, który zmieniał się wraz ze wzrostem średnicy cząstek.

Rozpoczynając badania biologiczne oceniono cytotoksyczność nanocząstek polistyrenu o różnych średnicach. Cząstki te spowodowały spadek żywotności i zmiany w aktywności metabolicznej jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka, ale w bardzo wysokich stężeniach powyżej 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Następnie dokonano oceny ich właściwości prooksydacyjnych. Dowiedziono, że nanocząstki polistyrenu indukują powstawanie reaktywnych form tlenu oraz wysoce reaktywnych form tlenu, w tym rodnika hydroksylowego. Z kolei analiza poziomu

peroksydacji lipidów i białek wykazała, że powodują one spadek fluorescencji tryptofanu w białkach oraz znaczny spadek fluorescencji kwasu *cis*-parynarowego.

W kolejnym etapie określono działanie genotoksyczne nanocząstek polistyrenu. Udowodniono, że badane nanocząstki o wszystkich analizowanych średnicach powodują powstawanie pęknięć jedno- i dwuniciowych w badanych komórkach krwi, oraz indukują pęknięcia dwuniciowe, ale tylko po narażeniu badanych komórek na mniejsze nanocząstki o średnicy 29 nm i 44 nm. Ponadto wykazano powstawanie zmodyfikowanych oksydacyjnie zasad purynowych i pirymidynowych po traktowaniu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej nanocząstkami polistyrenu. Większy poziom uszkodzeń oksydacyjnych zaobserwowano po zastosowaniu w teście genotoksyczności glikozylazy formamido-pirymidyny (Fpg). Dowiedziono także, że wzrost utleniania pirymidyny (zastosowanie w analizie endonukleazy III) następował przy wyższych stężeniach nanocząstek w porównaniu z próbkami do których dodawano Fpg. Wzrost poziomu 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny zaobserwowano tylko po ekspozycji jednojądrzastych komórek krwi na najmniejsze nanocząstki (29 nm). Powstałe uszkodzenia DNA spowodowane przez większe nanocząstki (44 nm i 72 nm) zostały całkowicie naprawione po 120 minutach, natomiast w przypadku mniejszych cząstek (29 nm) naprawa nie była w pełni skuteczna.

Trzeci etap badań dotyczył oceny właściwości proapoptotycznych badanych cząstek. Nanocząstki polistyrenu zwiększały liczbę komórek apoptotycznych, podwyższały poziom jonów wapnia w cytozolu komórek, zmniejszały wartość transbłonowego potencjału mitochondrialnego oraz zwiększały aktywność kaspazy 9 i 3. Ponadto najmniejsze nanocząstki o średnicy 29 nm spowodowały aktywację kaspazy 8.

W rozprawie posługiwano się licznymi metodami opartymi o cytofluorymetrię, fluorymetrię, spektrofotometrię, mikroskopię fluorescencyjną, mikroskopię sił atomowych, mikroskopię elektronową, elektroforezę i dwuwymiarową chromatografię cieczową.

Wykazano, że badane nanocząstki polistyrenu charakteryzowały się właściwościami cytotoksycznymi, prooksydacyjnymi, genotoksycznymi i proapoptotycznymi. Porównując działanie nanocząstek o różnych średnicach można stwierdzić, że najmniejsze nanocząstki (29 nm) wykazywały największą toksyczność względem badanych komórek. Powodowały one zmiany ww. parametrów już przy bardzo niskich stężeniach w porównaniu z cząstkami o większej średnicy, co może być związane z ich łatwiejszym wnikaniem do komórek ze względu na małe rozmiary i mniejszą wartość ujemnego potencjału zeta.

## STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

### Summary

Plastic pollution of the environment is now considered to be a global problem. Huge amounts of plastics waste enter the environment every year due to poor waste management and insufficient recycling as well as due to the long decomposition period of these plastics. In 2021, 390.7 million tons of plastic were produced worldwide, including 57.2 million tons in Europe. A serious ecotoxicological threat to organisms are particles formed from the breakdown of large pieces plastics so-called microparticles with diameters  $< 5000$  nm and nanoparticles with diameters  $< 100$  nm, which have been found in air, water, soil and food. Micro and nanoparticles are widely used in branches of industry, among others pharmaceutical, laboratory and cosmetics.

One of the most studied nanometer-structured synthetic plastics is polystyrene, which is formed by polymerization of styrene monomers. This plastic is used for packaging, production of electronics devices, household appliances, as well as to insulate buildings (styrofoam). Polystyrene particles, due to their small size, can easily enter living organisms through the respiratory, digestive or skin systems, and consequently pass through biological barriers and accumulate in tissues.

The aim of the research of this dissertation was to evaluate the pro-oxidant, pro-apoptotic and genotoxic effects of polystyrene nanoparticles (PS-NP) with different diameters (29 nm, 44 nm and 72 nm) in human peripheral blood mononuclear cells.

In this dissertation, the physico-chemical properties of polystyrene nanoparticles were tested to confirm the parameters of these particles declared by the manufacturers. The AFM and SEM images were consistent with the parameters stated in the labels of the purchased particles. Tests performed using the DLS technique of polystyrene nanoparticles incubated in water confirmed the particle diameter provided by the manufacturers, while incubation of the tested particles in RPMI medium significantly increased their diameter by up to three times for the smallest nanoparticles. In addition, the zeta potential was evaluated, which showed a significant change in the studied parameter depending on the particle size.

Starting with biological studies, the cytotoxicity of polystyrene nanoparticles of various diameters was evaluated. These particles caused a decrease in viability and changes in metabolic activity of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), but only at very high concentrations of above  $300 \mu\text{g/mL}$ .

Then, pro-oxidant properties of tested PS-NPs were evaluated. Polystyrene nanoparticles have been shown to induce the formation of reactive oxygen species (ROS) and highly reactive oxygen species, including hydroxyl radical. In turn, analysis of lipid and protein peroxidation showed, that PS-NPs caused a decrease in tryptophan fluorescence of proteins and induced a significant decrease in the fluorescence of cis-parinaric acid.

In the next phase, genotoxic effects of polystyrene nanoparticles were determined. PS-NPs of all analyzed diameters have been shown to induce single and double strand-breaks in studied cells, as well as caused double strand-breaks formation, but only after the exposure to smaller nanoparticles with diameters of 29 nm and 44 nm. In addition, it has been demonstrated the formation of oxidized purine and pyrimidine bases after treatment of peripheral blood mononuclear cells with tested polystyrene nanoparticles. Higher oxidative damage was observed when formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) was used in the genotoxicity test. It was also proven that an increase in pyrimidine oxidation (the use of endonuclease III in the analysis) occurred at higher concentrations when compared to fpg-treated samples. An increase in 8-hydroxy-2-deoxyguanosine level was observed only after the exposure of tested cells to the smallest nanoparticles of 29 nm. The resulting DNA damage caused by larger nanoparticles of 44 nm and 72 nm was completely repaired after 120 min., while the repair of DNA lesions was not fully effective in the cells treated with the smallest particles of 29 nm.

The third step of this study was to assess proapoptotic properties of tested particles. Polystyrene nanoparticles increased the number of apoptotic cells, increased the level of cytosolic calcium ions, decreased transmembrane mitochondrial potential, and increased the activity of caspase-9 and caspase-3. In addition, the smallest nanoparticles of 29 nm in diameter, induced caspase-8 activation.

In this dissertation, number of methods was used based on cytofluorimetry, fluorimetry, spectrophotometry, fluorescence microscopy, atomic force microscopy, electron microscopy and two-dimensional liquid chromatography.

The tested NP-PSs are characterized by cytotoxic, pro-oxidative, genotoxic and proapoptotic properties. Comparing the effects of nanoparticles of different diameters, it can be concluded that the smallest nanoparticles of 29 nm are the most toxic to the tested cells. They caused changes in the above-mentioned parameters at lower concentrations compared to larger particles, which may be related to their easier penetration into cells due to their smaller size and lower value of negative zeta potential.